

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許公開 号

特開平11-326775

(43) 公開日 平成11年(1999)11月26日

(51) IntCl<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 2 B 21/06

G 0 2 B 21/06

G 0 1 N 21/64

G 0 1 N 21/64

E

G 0 2 B 21/02

G 0 2 B 21/02

Z

審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平11-61495

(22) 出願日 平成11年(1999) 3 月 9 日

(31) 優先権主張番号 特願平10-59892

(32) 優先日 平10(1998) 3 月11日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目43番 2 号

(72) 発明者 富岡 正治

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目43番 2 号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

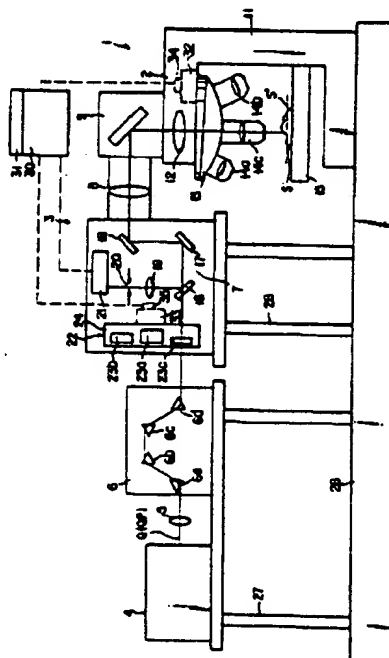
(74) 代理人 弁理士 鈴木 武彦 (外 4 名)

(54) 【発明の名称】 多光子励起レーザ顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】光路上に選択的に配置可能な光学部材の光路長に応じて、容易に最適な条件で観察可能なレーザ顕微鏡を提供する。

【解決手段】多光子励起走査型レーザ顕微鏡は、波長幅を有するパルスレーザービームを発振するレーザ光源4を有する。パルスレーザービームの照射により標本Sは多光子励起現象で蛍光する。レーザビームの光路を形成する光学系3は、プレチャープコンベンセータ6と、走査光学ユニット7と、光路上に択一的に配置可能な倍率の異なる複数の対物レンズ14a、14b、14cと、を有する。光学系3は、対物レンズのいずれを選択した場合にも、断面S'におけるレーザビームのパルス幅を一定にするための補正機構22を有する。補正機構22は、光路上に択一的に配置可能な複数の補正板23a、23b、23cを有する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】観察対象の標本を配置するための配置部

と、  
多光子励起現象により蛍光を発するように前記標本を励起するためのパルスレーザビームを出射するためのレーザ光源と、

前記標本の蛍光を検出するための検出器と、

前記レーザ光源から前記標本へ前記パルスレーザビームを導くために前記パルスレーザビームの光路を形成する光学系と、

を具備し、前記光学系は、

前記パルスレーザビームが前記光学系を通過する際に、前記パルスの波長幅に起因して生じる前記パルスレーザビームのパルス幅の広がりを抑制するため、前記光路上に配設されたプレチャープコンベンセータと、

前記光路上に選択的に配置可能な光学部材と、

前記光学部材の光路長に対応し、前記光学系の焦点面における前記パルスレーザビームのパルス幅が一定となるように前記光路の光路長を補正するための光学的補正手段を具備する補正機構と、を有することを特徴とする多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項2】前記光学系は、前記標本を前記パルスレーザビームで走査するための走査機構を更に有することを特徴とする請求項1に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項3】前記光学部材は、前記標本に対して前記パルスレーザビームを集光するように、前記光路上に択一的に配置可能な複数の対物レンズであることを特徴とする請求項1に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項4】前記光学部材は、前記標本に対して前記パルスレーザビームを集光するように、前記光路上に択一的に配置可能な複数の対物レンズと、前記プレチャープコンベンセータと前記対物レンズとの間に挿脱自在に設けられた平坦な光学素子とであることを特徴とする請求項1に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項5】前記平坦な光学素子は、ノマルスキー式の透過光観察用の光学素子であることと、前記顕微鏡は、前記パルスレーザビームの前記標本を透過した透過光を検出するための光学系及び検出器を更に具備することとを特徴とする請求項4に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項6】前記光学的補正手段は、前記光学部材の切替に連動して切替えられることを特徴とする請求項1に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項7】前記光学的補正手段は、前記光路上の前記パルスレーザビームが平行光束で且つ前記光束の角度変化がない位置に配置されることを特徴とする請求項1に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項8】前記光学的補正手段は、前記光学部材の光路長に応じて、前記光路の光路長が一定となるように前記光路上に択一的に配置可能な複数の光学的補正素子で

あることを特徴とする請求項1に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項9】前記光学的補正手段は、前記光学部材の光路長に応じて、異なる電圧を印加することにより、前記光路の光路長が一定となるように調整可能な光学的補正素子であることを特徴とする請求項1に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【請求項10】前記光学的補正手段は、前記光学部材の光路長に応じて、異なる圧力を印加することにより、前記光路の光路長が一定となるように調整可能な光学的補正素子であることを特徴とする請求項1に記載の多光子励起レーザ顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はパルスレーザビームを観察対象である標本に照射するタイプのレーザ顕微鏡に関し、特に、標本の多光子吸収による化学反応及び蛍光を検出するための多光子励起走査型レーザ顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】多光子励起法は、通常の1光子（単光子）で行われる励起を多光子で行う方法である。例えば2光子励起法では、400nm（単光子）の波長で行っていた蛍光励起が倍の波長800nmで行われる。この波長800nmでは2光子を用いて蛍光励起が行われる。

【0003】通常、蛍光顕微鏡に使用される水銀ランプや連続発振のレーザでは、単位時間当たりの光子密度が低いため、多光子励起現象を引き起こすためには、莫大な光強度が必要とされる。更に、光学系や標本へのダメージが大きくなる等の問題を解決しなければ実用には適さない。

【0004】このため、多光子励起法の光源としては、例えばサブピコ秒のパルスレーザビームを発振可能なものが用いられる。これは多光子励起現象がその単位面積、単位時間当たりの光子密度の2乗にほぼ比例した確率で発生するためである。このため、サブピコ秒のパルスレーザビームでは、複数の光子が存在する確率が高くなる。

【0005】例えば、特表平5-503149号公報には、サブピコ秒のパルスレーザビームを出射するレーザ光源と、このレーザ光源から出射されたパルスレーザビームで標本面（焦点面）を走査するための走査光学ユニットとを組合わせた2光子励起走査型レーザ顕微鏡が記載される。

【0006】一方、多光子励起に用いられるレーザ光源から出射されるサブピコ秒のパルスレーザビームは、完全に単色でなく、そのパルス幅と相関を持つある波長幅を有する。一般的に、光は、光学系を通過する場合、波長が短いほど媒質中での速度は遅く、波長が長いほど媒

質中での速度は速くなる特性を有する。従って、上述の如くパルスレーザビームが波長幅を有していると、パルスレーザビームが光学系を通過する際、波長によって通過時間に差が生じる。その結果、光学系に入射する前のパルス幅に比べ、光学系を通過した後のパルス幅が時間軸方向に広がってしまう。

【0007】多光子励起現象が生じる確率は、光子密度に依存するため、光学系の標本面（焦点面）上でのパルス幅の広がり、多光子励起現象が発生する確率を低下させる。従って、標本面上でパルス幅をなるべく広がらないようにすることが望まれる。

【0008】このような問題を解決するための一般的な方法として、所謂プレチャープコンベンションが知られている。プレチャープコンベンションは、パルスレーザビームをプリズムペア若しくはグレーティングペアに通すことにより、短い波長側の光を先に出す、言い換えれば長い波長側の光を遅らせるという方法である。

【0009】この方法は、例えば文献「Femtosecond pulse width control in microscopy by two-photon absorption autocorrelation; G.J. Brakenhoff, M. Muller & J. Squier; J. of Microscopy, Vol. 179, Pt. 3, September 1995, pp. 253-260」に記載される。詳しい説明は省略するが、この文献には、プレチャープコンベンセータとして使用されるプリズムペア若しくはグレーティングペアを移動調整することにより標本面でのパルスレーザビームのパルス幅を任意に変えられることが記載される。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】しかし、多光子励起走査型レーザ顕微鏡が、択一的に使用される複数の対物レンズを有する場合、対物レンズが夫々異なる光路長を有するため、プレチャープコンベンセータによる補正の程度も各対物レンズに応じて異なってくる。即ち、プレチャープコンベンセータを、ある1つの対物レンズに合わせて標本面におけるパルスレーザビームのパルス幅が最小となるように調整しても、他の対物レンズの場合は標本面におけるパルス幅が広がってしまう。ここで、本明細書において、単に光路長という場合は、光学素子の幾何学的長さではなく、光学素子が形成する光路の光学的長さを意味するものとする。

【0011】この走査型レーザ顕微鏡においても、顕微鏡観察と同様に、先ず広範囲の観察が可能な低倍率の対物レンズを使用して標本における観察対象を検索し、この後に細部を観察するための高倍率の対物レンズに切替えて使用するのが一般的である。この際、対物レンズを切替えることによって標本面でのパルスレーザビームのパルス幅が変化すると、最適な条件で多光子励起現象を引き起こすことができなくなる。

【0012】もし、この問題をプレチャープコンベンセ

ータの調整により対応しようとする、その調整に費やす時間に比例して標本から発せられる蛍光が褪色してしまうという問題が発生する。標本の蛍光の褪色を防ぐ対策としては、プレチャープコンベンセータの調整時に観察視野内から標本を移動するといった方法が考えられる。この方法では、プレチャープコンベンセータの調整後に再び観察視野内に標本を移動しなければならない。しかし、標本を移動前と全く同じ位置に戻すことは非常に困難であるため、この方法は観察及び測定に対して実用的ではない。

【0013】本発明の目的は、波長幅を有するパルスレーザビームを使用する多光子励起レーザ顕微鏡において、光路上に選択的に配置可能な光学部材の光路長に応じて、容易に最適な条件で観察することを可能とすることである。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明の第1の視点は、多光子励起レーザ顕微鏡において、観察対象の標本を配置するための配置部と、多光子励起現象により蛍光を発するように前記標本を励起するためのパルスレーザビームを出射するためのレーザ光源と、前記標本の蛍光を検出するための検出器と、前記レーザ光源から前記標本へ前記パルスレーザビームを導くために前記パルスレーザビームの光路を形成する光学系と、を具備し、前記光学系は、前記パルスレーザビームが前記光学系を通過する際に、前記パルスの波長幅に起因して生じる前記パルスレーザビームのパルス幅の広がりを抑制するため、前記光路上に配設されたプレチャープコンベンセータと、前記光路上に選択的に配置可能な光学部材と、前記光学部材の光路長に対応し、前記光学系の焦点面における前記パルスレーザビームのパルス幅が一定となるように前記光路の光路長を補正するための光学的補正手段を具備する補正機構と、を有することを特徴とする。

【0015】本発明の第2の視点は、第1の視点の多光子励起レーザ顕微鏡において、前記光学系は、前記標本を前記パルスレーザビームで走査するための走査機構を更に有することを特徴とする。

【0016】本発明の第3の視点は、第1の視点の多光子励起レーザ顕微鏡において、前記光学部材は、前記標本に対して前記パルスレーザビームを集光するように、前記光路上に択一的に配置可能な複数の対物レンズであることを特徴とする。

【0017】本発明の第4の視点は、第1の視点の多光子励起レーザ顕微鏡において、前記光学部材は、前記標本に対して前記パルスレーザビームを集光するように、前記光路上に択一的に配置可能な複数の対物レンズと、前記プレチャープコンベンセータと前記対物レンズとの間に挿脱自在に設けられた平坦な光学素子とであることを特徴とする。

【0018】本発明の第5の視点は、第4の視点の多光

子励起レーザ顕微鏡において、前記平坦な光学素子は、ノマルスキー式の透過光観察用の光学素子であることと、前記顕微鏡は、前記パルスレーザビームの前記原本を透過した透過光を検出するための光学系及び検出器を更に具備することを特徴とする。

【0019】本発明の第6の視点は、第1の視点の多光子励起レーザ顕微鏡において、前記光学的補正手段は、前記光学部材の切替えに連動して切替えられることを特徴とする。

【0020】本発明の第7の視点は、第1の視点の多光子励起レーザ顕微鏡において、前記光学的補正手段は、前記光路上の前記パルスレーザビームが平行光束で且つ前記光束の角度変化がない位置に配置されることを特徴とする。

【0021】本発明の第8の視点は、第1の視点の多光子励起レーザ顕微鏡において、前記光学的補正手段は、前記光学部材の光路長に応じて、前記光路の光路長が一定となるように前記光路上に択一的に配置可能な複数の光学的補正素子であることを特徴とする。

【0022】本発明の第9の視点は、第1の視点の多光子励起レーザ顕微鏡において、前記光学的補正手段は、前記光学部材の光路長に応じて、異なる電圧を印加することにより、前記光路の光路長が一定となるように調整可能な光学的補正素子であることを特徴とする。

【0023】本発明の第10の視点は、第1の視点の多光子励起レーザ顕微鏡において、前記光学的補正手段は、前記光学部材の光路長に応じて、異なる圧力を印加することにより、前記光路の光路長が一定となるように調整可能な光学的補正素子であることを特徴とする。

【0024】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について図面を参照して説明する。なお、以下の説明において、略同一の機能及び構成を有する構成要素については、同一符号を付し、重複説明は必要な場合にのみ行う。

【0025】図1は本発明の実施の形態に係る多光子励起走査型レーザ顕微鏡1を示す構成図である。

【0026】顕微鏡1は、標本Sに対して照射するパルスレーザビームを射出するためのレーザ光源4と、レーザ光源4と標本Sとの間でレーザビームを案内するための光路を形成する光学系3とを有する。光学系3は、標本Sを配置するためのステージ15を有する顕微鏡本体2内の光学素子も含む多数の光学素子により構成される。

【0027】顕微鏡1は、床からの振動を排除するための除振台26上に配設される。除振台26上には、2つの架台27、28が配設される。架台27上には、レーザ光源4、ビームコリメータ5及びアレチャープコンベンセータ6が配設される。架台28上には、走査光学ユニット7及び補正機構22が配設される。走査光学ユニ

ット7及び後述するフォトマルチプライヤ21は、操作パネル31を有するコンピュータ30に接続される。

【0028】レーザ光源4は、近赤外域の波長で、サブピコ秒の極短パルスQPを発振する。波長幅の広さは、パルス幅の大きさに反比例するため、ここで使用される極短パルスQPは、数ナノメートル程度の波長幅を有する。

【0029】レーザ光源4からのレーザビームQの光路上にビームコリメータ5及びアレチャープコンベンセータ6が配置される。ビームコリメータ5は、レーザ光源4から出射されたレーザビームQを平行光束にコリメートする。アレチャープコンベンセータ6は、レーザビームQが光学系3を通過する際に、パルスの波長幅に起因して生じるパルス幅の広がりを打ち消すように予め調整するために使用される。具体的には、アレチャープコンベンセータ6は、例えばプリズム等の光学素子6a〜6dから構成され、入射されたコリメート済みのレーザビームQに対して、短波長ほど先となるように波長順にアレチャープコンベンセータ6から出射させる作用を有する。

【0030】走査光学ユニット7は、アレチャープコンベンセータ6から出射されたレーザビームQにより標本Sの断面（焦点面）S'を走査するためのものである。この走査光学ユニット7の出射側には、リレーレンズ8、光路折り曲げユニット9を介して顕微鏡本体2が配設される。なお、これらリレーレンズ8、光路折り曲げユニット9及び顕微鏡本体2は、光軸が一致するように配置される。

【0031】顕微鏡本体2は除振台26上に固定されたコ字形状の筐体11を有する。コ字形状の筐体11の上部には結像レンズ12が配設され、且つ結像レンズ12の下方側に倍率の異なる複数の対物レンズ、例えば3つの対物レンズ14a、14b、14cを取り付けたレボルバ13が回転自在に配設される。対物レンズ14a、14b、14cは、択一的に光軸上に配置可能となるように構成される。レボルバ13の下方には、標本Sを載置するためのステージ15が配設される。ステージ15は、筐体11に対して上下に位置調整可能に取付けられる。

【0032】標本Sは極短パルスQPのレーザビームQが照射されると、多光子励起現象により蛍光を発する。走査光学ユニット7には、標本Sで生じた蛍光とアレチャープコンベンセータ6から出射されたレーザビームQとを分離するためのダイクロイックミラー16が配設される。

【0033】ダイクロイックミラー16を透過するレーザビームQの光路上には、互いに直交した方向にレーザビームQを走査駆動するための一対のガルバノミラー17、18と、走査駆動されたレーザビームQを顕微鏡本体へ導くためのリレーレンズ8とが配置される。

【0034】一方、ダイクロイックミラー16によって分離される蛍光検出のための光路上には、集光レンズ19、ピンホール20、及びフォトマルチプライヤ21が配置される。集光レンズ19は標本Sからの蛍光をピンホール20に集光させるために使用される。ピンホール20は標本Sと共役な位置に配置され、標本からの光に含まれる焦点面以外の雑光を除去する。なお、多光子励起走査型レーザ顕微鏡においては、対物レンズ14a、14b、14cの焦点面、つまり標本Sの断面S'でのみ多光子励起現象が生じるので、ピンホール20は走査光学ユニット7に必ずしも必要でない。

【0035】対物レンズ14a、14b、14cは夫々異なる光路長を有する。このため、アレチャープコンベンセータ6を、対物レンズの1つに合わせて断面S'（光学系3の焦点面）における極短パルスQPのパルス幅が最小となるように調整しても、対物レンズを切替えた場合は断面S'におけるパルス幅が広がる可能性がある。この問題に対応するために、対物レンズ14a、14b、14cのいずれを選択した場合にも、断面S'におけるパルス幅が一定で且つ最小となるように光学系3の光路長を補正するように補正機構22が配設される。なお、前述の如く、本明細書において、単に光路長という場合は、光学素子の幾何学的長さではなく、光学素子が形成する光路の光学的長さを意味するものとする。

【0036】具体的には、本実施の形態において、補正機構22は走査光学ユニット7と共通の筐体内に配設される。補正機構22は、平行光束にコリメートされたレーザビームQの光路上に択一的に配置可能な補正板23a、23b、23cを具備する。補正板23a、23b、23cは、夫々対物レンズ14a、14b、14cに対応して光路長が設定された同一のガラス材からなる。対応する対物レンズ14a、14b、14cと補正板23a、23b、23cとのペアのいずれが使用された場合にも、レーザ光源4から断面S'（光学系3の焦点面）の光路長が同一となるように設定される。

【0037】図2に示す如く、補正板23a、23b、23cは回転可能なターレット24に取付けられる。ターレット24を回転させることにより、補正板23a、23b、23cが光学系3の光軸上に択一的に配置可能となる。

【0038】次に、図1に示す多光子励起走査型レーザ顕微鏡の作用について説明する。

【0039】レーザ光源4から極短パルスQPのレーザビームQが出射されると、このパルスレーザビームQは、先ずビームコリメータ5により平行光束に変換される。次に、レーザビームQは、アレチャープコンベンセータ6に入射して、断面S'でレーザビームQのパルス幅が最小になるように調整されて走査光学ユニット7に導入される。

【0040】次に、走査光学ユニット7に導入されたレ

ーザビームQは、各対物レンズ14a、14b、14cに対応するいずれか1つの補正板23a、23b、23c、例えば、対物レンズ14aに対応した補正板23aを通過し、この対物レンズ14aに対応して断面S'におけるレーザビームQのパルス幅が一定となるように整形される。

【0041】次に、レーザビームQは、走査光学ユニット7のダイクロイックミラー16に入射する。ダイクロイックミラー16を透過したレーザビームQは、一对のガルバノミラー17、18で反射され、続いて、リレーレンズ8、光路折り曲げユニット9を通過して顕微鏡本体2の光学系に入射する。

【0042】顕微鏡本体2に入射したレーザビームQは、結像レンズ12によって、対物レンズ14a、14b、14cの1つ、例えば対物レンズ14aの瞳径を満足するような光束径に変換されて対物レンズ14aに導入される。次に、このように対物レンズ14aに導入されたレーザビームQは、その対物レンズ14aにより、ステージ15上に設置された断面S'に集光される。

【0043】標本Sは、パルスレーザビームQの照射により、断面S'において2光子励起現象により部分的に励起される。これにより、標本Sの断面S'からは、染色した蛍光色素に応じた蛍光が発せられる。この蛍光は、再び対物レンズ14aに取り込まれ、結像レンズ12、光路折り曲げユニット9、リレーレンズ8、一对のガルバノミラー18、17を通してダイクロイックミラー16に入射し、パルスレーザビームQと分離される。

【0044】蛍光は、ダイクロイックミラー16によって反射され、集光レンズ19によってピンホール20に集光される。そして、ピンホール20を通過した蛍光のみがフォトマルチプライヤ21に入射する。このフォトマルチプライヤ21は、蛍光を受光してその光量に応じた電気信号をコンピュータ30に対して出力する。

【0045】上述の操作と共に、走査光学ユニット7の一对のガルバノミラー17、18がXY方向に駆動され、レーザビームQで断面S'がXY方向に走査される。コンピュータ30は、この走査により得られるフォトマルチプライヤ21の出力信号をガルバノミラー17、18の走査駆動に同期させることで、標本Sの断面S'の2次元画像を構築することができる。

【0046】このようにして、標本Sの2次元画像を得る際、その用途に応じてレボルバ13を回転させ、対物レンズ14aを、対物レンズ14c（または対物レンズ14b）に切替える場合がある。この場合、対物レンズの切替と略同時に補正機構22のターレット24を回転させることで、対物レンズ14cに対応する補正板23cを平行光束にコリメートされたパルスレーザビームQの光路上に配置する。

【0047】上述の如く、補正板23a、23b、23cは、対応する対物レンズ14a、14b、14cと組

合わされた場合、断面S'におけるパルス幅が一定となるように設定される。従って、例えば、対物レンズ14aと補正板23aとを用いて初期段階（装置セットアップ時）に断面S'でのレーザービームQのパルス幅を最小に調整すれば、その後、他の対物レンズと補正板とのペアを使用した場合にも、アレチャープコンベンセータ6の調整は不要となる。即ち、対応する対物レンズ14a、14b、14cと補正板23a、23b、23cとのペアのいずれが使用された場合にも、常に断面S'におけるパルス幅を一定で且つ最小とすることができる。

【0048】従って、図1に示す多光子励起走査型レーザー顕微鏡によれば、いずれの対物レンズ14a、14b、14cを切替えて使用した場合にも、最適な条件下で多光子励起現象を引き起こすことができる。また、瞬時に最適な状態で観察を開始できるため、蛍光の褪色を最小限に抑えることができ、作業効率が向上する。また、各補正板23a、23b、23cは、平行光束にコリメートされたレーザービームQの光路上に挿入されるので、各補正板23a、23b、23cが各対物レンズ14a、14b、14cの性能を劣化させることなく、システム全体の光学性能を容易に維持できる。

【0049】なお、補正板23a、23b、23cは、手動による切替の他に、対物レンズ14a、14b、14cの切替に電氣的または機械的に連動して切替えるようにすることもできる。この場合、装置の操作が簡単となり、作業効率が向上すると共に、各補正板23a、23b、23cの誤挿入が発生しなくなる。例えば、これらの切替の電氣的に完全に連動させる機構としては、図1に破線で示すようなものを採用することができる。

【0050】即ち、この連動機構においては、レボルバ13及びターレット24が夫々ステップモータ32、33で駆動される。また、ステップモータ32、33の回転軸に夫々エンコーダ34、35が連結される。これらの部材32～35はコンピュータ30に接続される。また、コンピュータ30に、いずれの対物レンズ14a、14b、14cを使用するかを選択入力するための操作パネル31が配設される。これにより、操作パネル31からの入力に基づいて、対物レンズ14a、14b、14cと補正板23a、23b、23cとを連動して自動的に切替えることができる。

【0051】また、上述した切替機構の他、例えば、レボルバに取付けられる対物レンズの位置及び倍率を予め設定しておき、手動によるレボルバの回転時に、切替えられた対物レンズに対応した補正板を判別し、補正板を切替えるようにしてもよい。

【0052】補正板23a、23b、23cは、レーザービームQが平行光束で且つ光束の角度変化がない位置、例えばレーザー光源4からダイクロイックミラー16までの間の位置で光路上に配置することが望ましい。このため、アレチャープコンベンセータ6と走査光学ユニット

7との間の位置（図1に示す位置）の他、例えばビームコリメータとアレチャープコンベンセータ6との間に設置することができる。

【0053】また、図3に示す如く、各補正板23a、23b、23cは、各対物レンズ14a、14b、14cの光学系が無窮遠系であれば、レボルバ13または対物レンズに内蔵することも可能であり、機械的に連動する機構の代用とすることもできる。この構成によれば、装置構成がシンプルとなると共に安価となり、且つ誤動作の心配もなくなる。

【0054】また、上記実施の形態では、補正板に同一のガラス材を用い、板厚を変えることで光路長を変化させていたが、本発明はこれに限定されるものではない。例えば、同じ板厚に形成した補正板のガラス材を変えることで屈折率を変化させ、光路長を設定することができる。この場合、各補正板23a、23b、23cは、幾何学的寸法が全く同じになるので、補正機構22に取り付けるための部品を共通化できる。

【0055】図4乃至図6は補正機構22の変更例に係る補正機構41、46、51を示す概略図である。

【0056】図4に示す補正機構41は、補正板23a、23b、23cを夫々矩形のブロック42に取付けた例である。矩形のブロック42は矩形の回転子43に着脱自在に固定される。この場合、回転子43の回転により、補正板23a、23b、23cが光学系3の光軸上に択一的に配置可能となる。

【0057】図5に示す補正機構46は、補正板23a、23b、23cをスライド可能なスライダ47に取付けた例である。この場合、スライダ47の直線動作により、補正板23a、23b、23cが光学系3の光軸上に択一的に配置可能となる。

【0058】図6に示す補正機構51においては、駆動部53による電氣的或いは物理的な外部作用により、異なる光路長を光路上に択一的に提供可能な単一の光学的補正要素52が使用される。光学的補正要素52としては、電圧の印加により光路長が変化する平行平板（EOD素子）や、圧力の印加により光弾性を利用して光路長が変化する平行平板を使用することができる。

【0059】図7は図1に示す顕微鏡1にノルムスキー式の透過光観察機能を追加した場合の変更例を示す概略図である。

【0060】この変更例においては、偏光子61及びノルムスキープリズム等に代表される複屈折素子62がスライダ（図示せず）に取付けられ、走査光学ユニット7の内部で且つダイクロイックミラー16よりアレチャープコンベンセータ6側の光路上に一体的に挿脱自在となる。この場合、フォトマルチプライヤ21による蛍光の検出のみを行う際、偏光子61及び複屈折素子62を光路上から外すと光路長が変わってしまう。この問題に対応するため、偏光子61及び複屈折素子62の光路長に

11

対応した補正板23dが、ターレット24とは別体で且つ補正機構22の一部をなすスライダ24aに取付けられる。補正板23dは、偏光子61及び複屈折素子62が光路上から外れるのに連動して光路上に挿入される。

【0061】また、顕微鏡本体2の筐体11の下部には、ステージ15の開口15aの下方に位置するように、複屈折素子(ノマルスキープリズム)65及び偏光子66が取付けられる。更に、顕微鏡本体2の筐体11には、偏光子66を通過した透過光を反射し且つ検出するためのミラー67及び検出器68が取付けられる。

【0062】偏光子61、複屈折素子62、65及び偏光子66は、部分的に屈折率が僅かに異なる無色透明の物体や、微少な段差を有する不透明物体の表面など、目では検出できない位相情報を、偏光干渉により、干渉色のコントラストを付けて可視化する。従って、前述のフォトマルチプライヤ21で検出される蛍光から得られる情報に加えて、検出器68で検出される透過光から得られる情報から、標本Sの構造を立体的に捉えることができる。

【0063】なお、フォトマルチプライヤ21による蛍光の検出のみが必要な場合は、上部側の偏光子61及び複屈折素子62を光路上から外せばよい。また、これに連動して偏光子61及び複屈折素子62の光路長に対応した補正板23dを光路上に挿入する。これにより、ノマルスキー式の透過光観察機能と、フォトマルチプライヤ21による蛍光検出とを切替えて使用する顕微鏡であっても、常に断面S'におけるパルス幅が一定で且つ最小とすることができる。なお、図示の構成に代え、偏光子61及び複屈折素子62の光路長を考慮した補正板(図示せず)を、補正板23a、23b、23cに加え

てターレット24上に配設するようにしてもよい。【0064】また、図7図示の顕微鏡においては、ノマルスキー式の透過光観察をおこなうための平坦な偏光子61及び複屈折素子62に対応する補正板23dに関して述べているが、本発明はこれに限られるものではなく、他の平坦な光学素子に関しても、これに対応した補正板を配設する場合に適用することができる。

【0065】また、上述の実施の形態及び変更例においては、標本SをパルスレーザービームQで走査するための走査機構として、レーザービームQを走らせるための一對のガルバノミラー17、18等を有する走査光学ユニット7を使用している。しかし、標本Sの走査は、標本SとレーザービームQとを相対的に移動させることにより達成できるものであるから、この走査には種々の機構を採用することができる。例えば、レーザービームQを静止させ、顕微鏡本体2のステージ15を走査のために駆動するような走査機構を使用してもよい。

【0066】

【発明の効果】以上述べたように、本発明によれば、パ

12

ルスレーザービームを使用すると共に複数の対物レンズを有する多光子励起レーザー顕微鏡において、光路上に選択的に配置可能な光学部材の光路長に応じて、容易に最適な条件で観察が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施の形態に係る多光子励起走査型レーザー顕微鏡を示す構成図。

【図2】図1に示す顕微鏡で使用される光路長の補正機構を示す概略平面図。

【図3】光路長の補正機構の変更例を示す概略側面図。

【図4】光路長の補正機構の別の変更例を示す概略平面図。

【図5】光路長の補正機構の更に別の変更例を示す概略平面図。

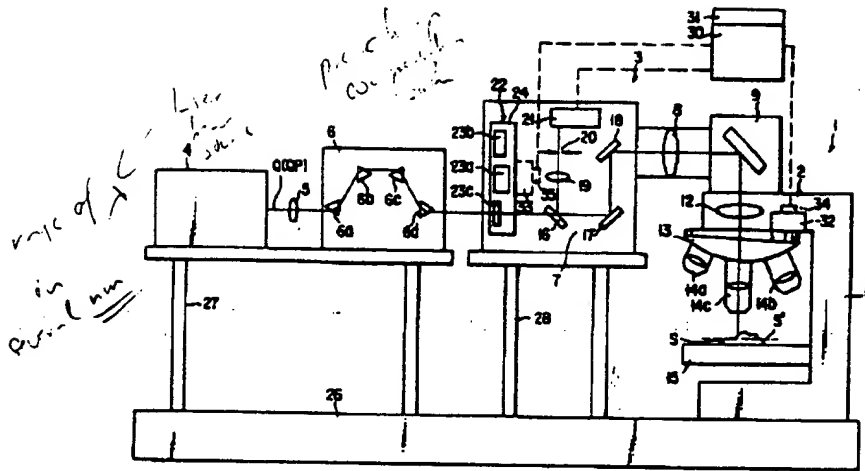
【図6】光路長の補正機構の更に別の変更例を示す概略側面図。

【図7】図1に示す顕微鏡にノマルスキー式の透過光観察機能を追加した場合の変更例を示す概略図。

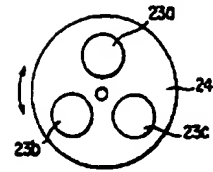
【符号の説明】

- 1：顕微鏡、
- 2：顕微鏡本体
- 3：光学系
- 4：レーザー光源
- 5：ビームコリメータ
- 6：プレチャープコンペンセータ
- 7：走査光学ユニット
- 12：結像レンズ
- 13：レボルバ
- 14a、14b、14c：対物レンズ
- 15：ステージ
- 16：ダイクロイックミラー
- 17、18：ガルバノミラー
- 19：集光レンズ
- 20：ピンホール
- 21：フォトマルチプライヤ
- 22、41、46、51：補正機構
- 23a、23b、23c、23d：補正板
- 24：ターレット
- 30：コンピュータ
- 31：操作パネル
- 32、33：ステップモータ
- 34、35：エンコーダ
- 52：光学的補正素子
- 61：偏光子
- 62、65：複屈折素子
- 66：偏光子
- 67：ミラー
- 68：検出器
- S：標本

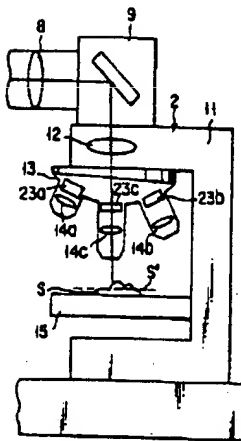
【図1】



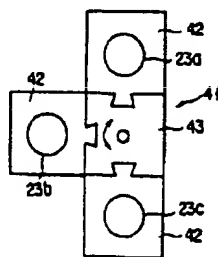
【図2】



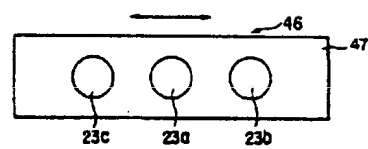
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

